

УДК 535.373.2 + 535-31

Кудря В. Ю.

СПЕКТРАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА ФОТОСТАБІЛЬНІСТЬ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ ТА ОЛІГОНУКЛЕОТИДІВ

Здійснено порівняльні дослідження спектральних властивостей та фотостабільності макромолекул ДНК, РНК, низки полі- та олігонуклеотидів. Підтверджено, що так само, як і в ДНК, у РНК нуклеотиди є майже незалежними поглинаючими центрами. На відміну від ДНК, в РНК не утворюється комплекс, подібний до АТ-комплексу, що є відповідальним за фосфоресценцію. Натомість у РНК основною пасткою триплетних збуджень є аденозинові ланки, які найстабільніші до дії УФ-випромінювання порівняно з іншими нуклеотидами, що, своєю чергою, забезпечує механізм самозахисту РНК щодо згубної дії УФ-випромінювання. Встановлено, що рибонуклеотиди є менш фотостабільними порівняно з відповідними їм дезоксирибонуклеотидами. Цей факт є одною з основних причин того, що ДНК більш фотостабільна ніж РНК.

Ключові слова: ДНК, РНК, фосфоресценція, фотостабільність.

Вступ

Нуклеїнові кислоти ДНК та РНК є найважливішими макромолекулярними сполуками, що містяться в кожній клітині будь-якої живої істоти. Вони відіграють провідну роль у зберіганні, передачі та реалізації спадкової інформації в ході індивідуального розвитку кожного організму. Фактично ДНК та РНК є функціонально діючими макромолекулами, які вже використовуються в живому організмі. Разом з високомолекулярними π -електронмісткими білками вони є основною частиною вірусів. Перші серйозні дослідження збуджених електронних станів нуклеїнових кислот (НК) проводилися ще у 60-х роках [1–4]. Основний об'єкт цих досліджень – поглинання, флюоресценція та фосфоресценція нуклеотидів та макромолекули ДНК. Значну увагу тут зосереджено на дослідженні перенесення енергії електронного збудження по триплетних рівнях вздовж ланцюга макромолекули ДНК, оскільки саме цей вид збуджень відповідає за ініціювання фотохімічних реакцій (наприклад, фоторуйнування) у більшості органічних π -електронмістких макромолекул. Зрозуміло, що перенесення енергії електронного збудження по триплетних рівнях має призвести до локалізації збудження на ланці, яка має найнижчий триплетний рівень. Однак експериментально для ДНК це не підтверджено. У дослідженні [2]

зроблено спробу довести, що фосфоресценція ДНК – випромінювання іонізованої π -електронної системи дТМФ (T^-). Пізніше було уточнено, що не T^- , а триплетний стан саме нейтрального дТМФ відповідає за випромінювання ДНК [3]. Проте факт, що спектр фосфоресценції дТМФ (вказаний у цій праці) зсунутий у короткохвильовий бік щодо спектра ДНК і що час згасання фосфоресценції удвічі більший, ніж у ДНК, дає підставу стверджувати, що це не так. Більш схожим на спектр ДНК є спектр полі(дАТ) [2–3]. Отже, радше тимідин, зв'язаний з аденозином, визначають фосфоресценцію ДНК. Аналогічних дослідження природи люмінесценції РНК майже немає. Мета цієї статті – дослідження впливу структури центрів локалізації триплетних збуджень в ДНК і РНК на фотостабільність цих макромолекул.

Методика експериментальних досліджень

Досліджувані зразки ДНК і РНК різного походження, а також полі-, оліго- та мононуклеотиди люб'язно надані З. Ю. Ткачуком та І. Я. Дубеєм (Інститут молекулярної біології та генетики НАН України). Нуклеотиди, що містяться в цих полі- та олігонуклеотидах, з'єднані між собою фосфатними групами PO_4H у положеннях 3' та 5' (за винятком тримера 2'5'A₃, де нуклеотиди з'єднані у положеннях 2' та 5'). Хі-

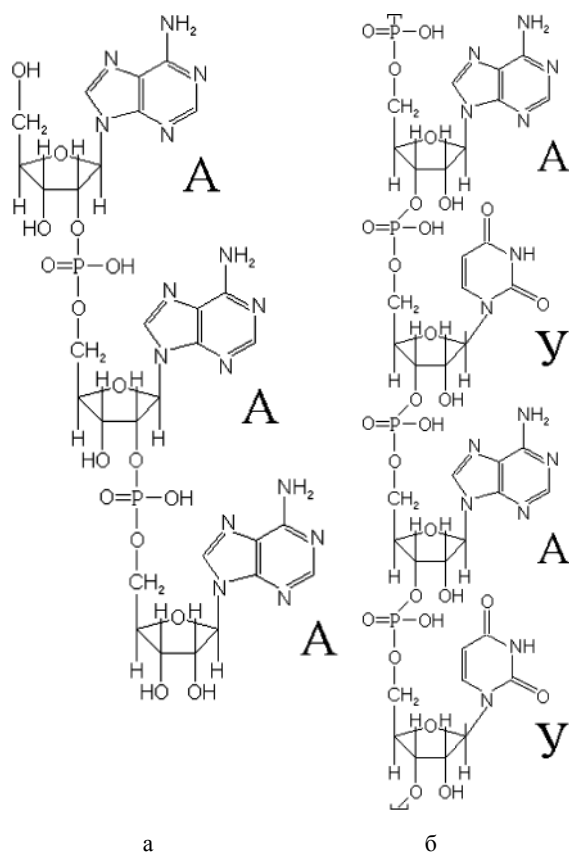


Рис. 1. Хімічні формули: а) тримера 2'5'-A₃ та б) одноланцюгового кополімеру полі(rApY)

мічні формули досліджуваних речовин зображено на рис. 1.

Спектри оптичного поглинання в діапазоні 200÷360 нм ($\sim 50000 \div 28000$ см⁻¹) реєструвалися за допомогою спектрофотометра Specord UV VIS. Спектри флюоресценції та фосфоресценції в діапазоні 290÷620 нм ($\sim 34500 \div 16000$ см⁻¹) реєструвалися при температурах 4,2÷77 К – на спектрофлюориметрі Hitachi MPF-4 та спектральному комплексі на базі МДР-2. Фоторуйнування здійснювалося за допомогою опромінення розчинів досліджуваних речовин ультрафіолетовим світлом ртутної лампи ДРТ-1000. Після певного часу експозиції УФ-світлом опромінюваного зразка відбувався запис спектра поглинання цього зразка на спектрофотометрі Specord UV VIS.

Похибка у визначенні положення смуг поглинання не перевищувала 50 см⁻¹ (20 см⁻¹), люмінесценції – 100 см⁻¹ (40 см⁻¹), що для досліджуваних широких смуг (≥ 1000 см⁻¹) цілком допустимо. Похибка у вимірюванні інтенсивності свідчення одного і того ж самого зразка не перевищувала 2 %.

Результати та їх обговорення

Наші попередні дослідження [5–8] показали, що спектри оптичного поглинання ДНК та олігонуклеотиду д(ЦЦЦГГГТТТААА) є дуже близь-

кими до адитивної суми спектрів поглинання відповідних нуклеотидів (рис. 2, кр. 2), тому нуклеотиди майже незалежні поглинаючі центри у ДНК, і всі електронні процеси починаються з початково окремо збуджених нуклеотидів-ланок. Тут досліджено зразки транспортної тРНК та оліго-РНК – короткого фрагмента дріжджової РНК. Спектри поглинання цих РНК майже збігаються між собою (рис. 2, кр. 3) і також дуже близькі до спектрів ДНК, д(ЦЦЦГГГТТТТААА) та суми спектрів поглинання нуклеотидів. Отже, так само, як і в ДНК у РНК нуклеотиди – незалежні поглинаючі центри, тому можуть бути використані для побудови схеми ієрархії енергетичних рівнів РНК. Використовуючи наші попередні дані [8, 9], уточнено положення збуджених енергетичних рівнів ланок РНК; вони визначалися: синглетного (S_1) – на перетині кривих спектрів поглинання та флюоресценції, триплетного (T_1) – на короткохвильовому краю спектра фосфоресценції (рис. 3). Слід зауважити, що взаємне розташування S_1 і T_1 – рівнів рибонуклеотидів рАМФ, рГМФ та рЦМФ таке саме, як і дезоксирибонуклеотидів дАМФ, дГМФ та дЦМФ [5–9], що, в принципі, може свідчити на користь версії про однаковість фотофізичних процесів в ДНК та РНК. Виняток становлять дТМФ та рУМФ, які не є точними аналогами один одному. Отже, розташування енергетичних рівнів у макромолекулі РНК повинно сприяти перенесенню енергії електронного збудження по триплетних рівнях (з наступною локалізацією та дезактивацією) на базу, яка має найнижчий триплетний рівень, – аденінову.

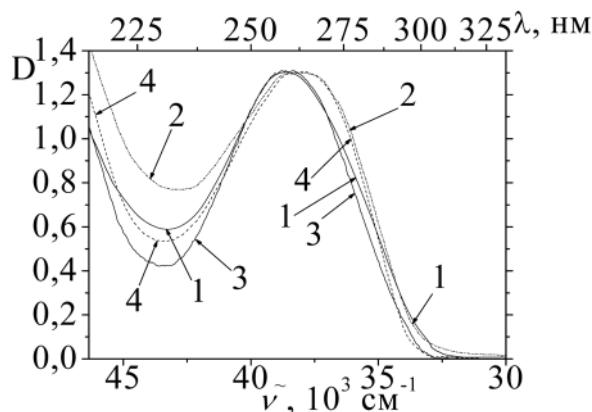


Рис. 2. Спектри оптичного поглинання 1) ДНК, 2) д(ЦЦЦГГГТТТТААА), 3) РНК та 4) сума (еквімолярні концентрації) спектрів поглинання нуклеотидів дАМФ, дТМФ, дГМФ, дЦМФ

Нами попередньо також показано [5–7], що, на відміну від поглинання, фосфоресценція ДНК та олігонуклеотиду д(ЦЦЦГГГТТТТААА) не є випромінюванням однієї ланки, а результатом дезактивації ексиплексо-подібного комплексу,

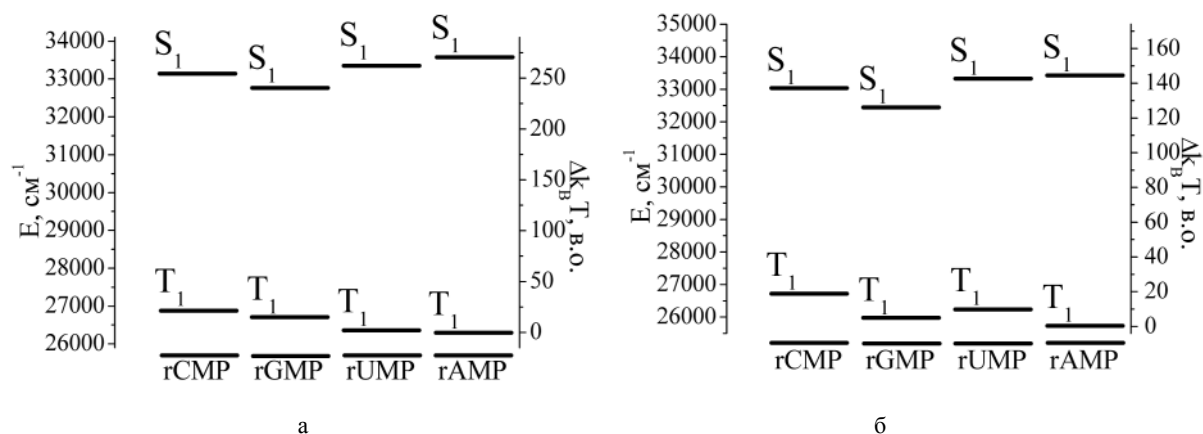


Рис. 3. Діаграма розташування синглетних і триплетних енергетичних рівнів рибонуклеотидів при а) $T = 4,2$ К та б) $T = 77$ К

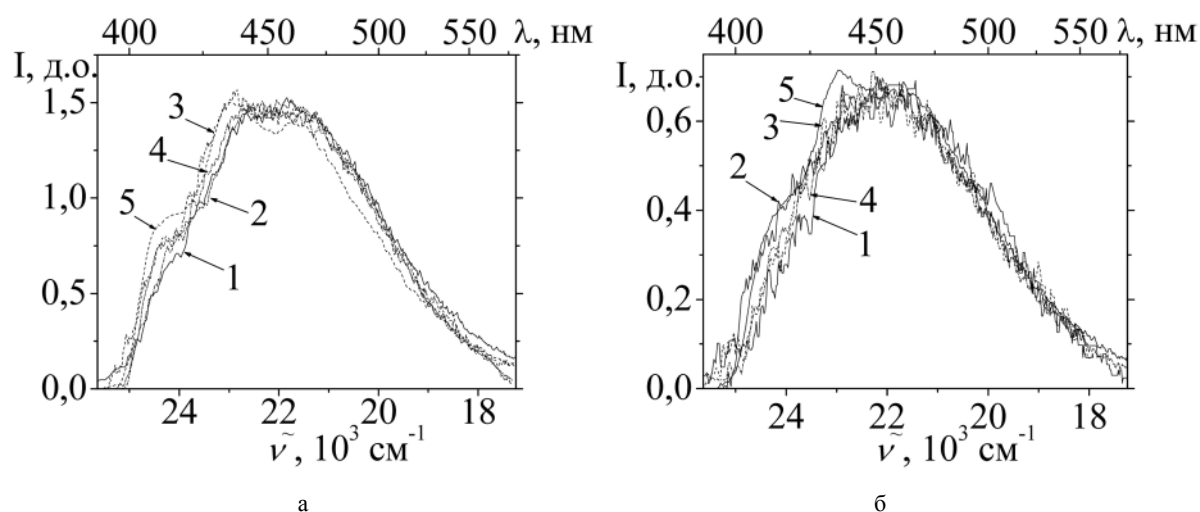


Рис. 4. Спектри фосфоресценції при а) $T = 4,2$ К та б) $T = 77$ К: 1) ДНК, 2) д(ЦЦЦГГГТТТААА), 3) полі(дАдТ)₂, 4) д(АТЦ) та 5) д(АТ). Збудження 300 nm. Водні розчини, $C = 10^{-4}$ М

що утворюється між сусідніми аденозиновими (А) і тимідиновими (Т) ланками. Це доведено порівняльними дослідженнями фосфоресценції сполук, які містять АТ-послідовність: криві спектрів фосфоресценції ДНК, дволанцюгового полімеру полі(дАдТ)₂, олігомеру д(ЦЦЦГГГТТТААА), тримеру д(АТЦ) та димеру д(АТ) дуже близькі (рис. 4) при обох температурах досліджень. Отже, нами доведено гіпотезу, висловлену в [2, 3], що саме аденозин-тимідинова пара визначає фосфоресценцію ДНК.

Виходячи зі сказаного, можна припустити, що і в РНК (яка схожа на ДНК і за хімічною, і частково за енергетичною структурою) повинен утворюватися комплекс, подібний до АТ. Тут досліджено два зразки РНК (тРНК та оліго-РНК) і тример 2'5'A₃, в якому нуклеотиди з'єднані «неприродним чином» у положеннях 5' та 2'. Спектр фосфоресценції 2'5'A₃ при температурі $T = 4,2$ К (рис. 5, а, кр. 3) за положенням основ-

них максимумів електронно-коливальної структури майже збігається зі спектром мономеру рАМФ, але з помітнішою структурою цих максимумів. Це є наслідком того, що збільшення кількості ланок призводить до їх жорсткішої фіксації завдяки сусідам і, як результат, зменшенню кількості ступенів вільності. Подальше збільшення кількості ланок (наприклад, олігомер д(АААААААААААА), рис. 5, а, кр. 5) спричиняє більшу структурованість основних максимумів і зсуву (~ 1 нм) 1-го і 2-го максимумів у бік менших довжин хвиль (більших енергій), що загалом може бути кваліфіковано як експериментальні похибки. Крім того, відбувається невеликий перерозподіл інтенсивностей цих максимумів, що стандартні для більшості π -електронмістких сполук (див., наприклад, [10; 11] для кополімерів вінілкарбазола (ВК) з метилметакрилатом з різними середніми відстанями між π -електронмісткими ланками ВК). Спектр

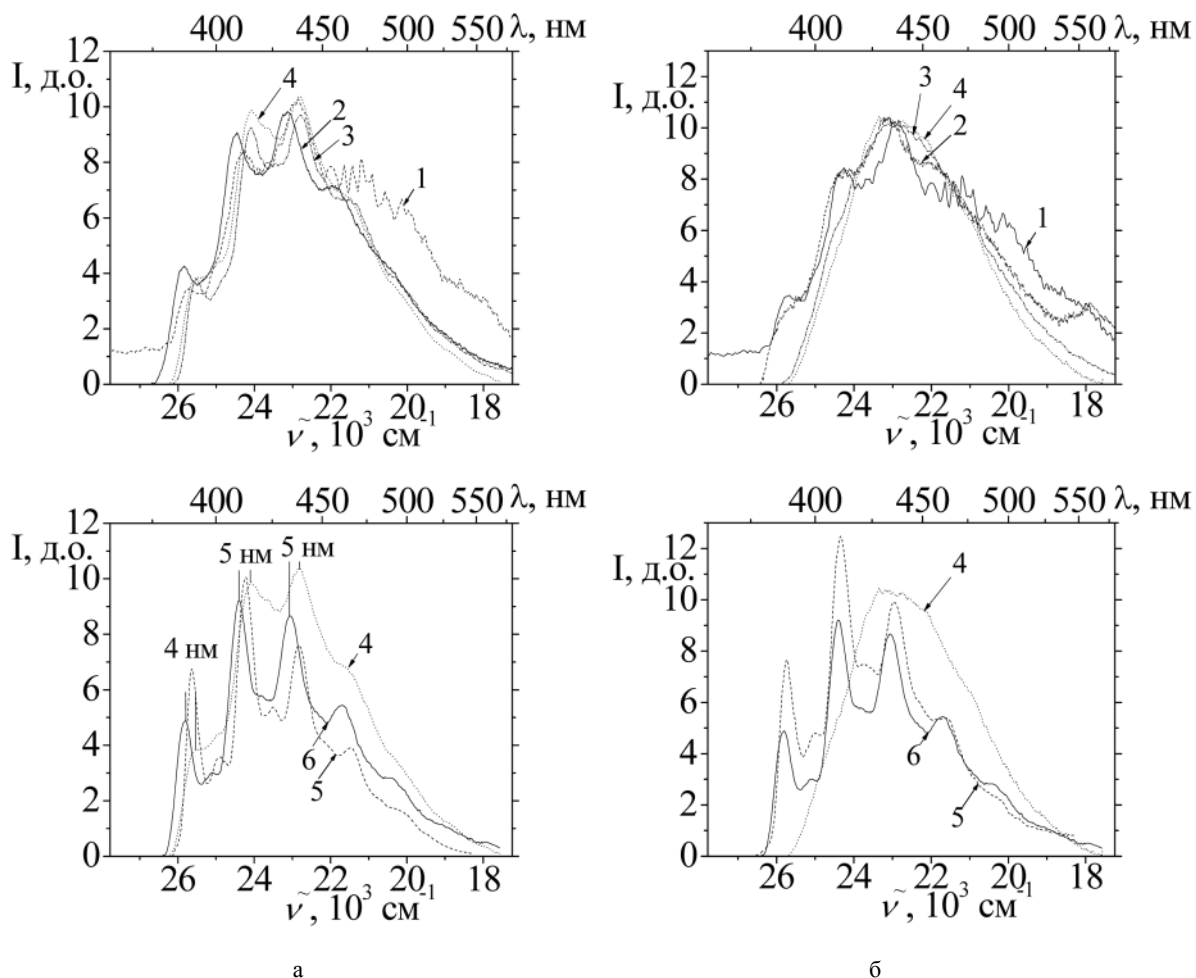


Рис. 5. Спектри фосфоресценції при а) $T = 4,2$ К та б) $T = 77$ К: 1) тРНК, 2) оліго-РНК, 3) $2'5'A_3$, 4) рАМФ, 5) д(AAAAAAAAAAAAA) та б) полі(рАрУ). Збудження 260 nm. Водні розчини, $C = 10^{-4}$ М

фосфоресценції тРНК (рис. 5, а, кр. 1) також має чітко виражену аденінову структуру, але 1-й і 2-й максимум зміщені у бік менших довжин хвиль на 3 нм, що вже не можна вважати похибкою, і, радше, є впливом залишків π -електронмістких амінокислот, що містяться у супутних нуклеїновим кислотам білках. Крім того, широкі короткохвильова (~ 370 нм) та довгохвильова (~ 500 нм) смуги теж є впливом залишків амінокислот. Спектр фосфоресценції оліго-РНК (рис. 5, а, кр. 2) має аденінову структуру, але повністю зміщений у бік менших довжин хвиль відносно рАМФ та $2'5'A_3$ на ~ 5 нм. За спектральним положенням, спектр фосфоресценції оліго-РНК швидше близький до спектра одноланцюгового кополімеру полі(рАрУ) (рис. 5, а, кр. 6) (спеціально дослідженого для встановлення природи фосфоресценції РНК). Таким чином, невелика взаємодія між сусідніми ланками РНК, що призводить до жорсткішої фіксації нуклеотидних ланок, має спектральним проявом зсув усього спектру фосфоресценції на $\sim 4\div 5$ нм. Незважаючи на це, центром локалізації та дезакти-

вації триплетних збуджень в усіх досліджених сполуках є аденінові ланки. При цьому, всупереч очікуванням, в оліго-РНК, тРНК та полі(рАрУ) комплекс, подібний до АТ в макромолекулі ДНК, не утворюється. Отже, незважаючи на певну схожість і за хімічною, і частково за енергетичною структурою, в макромолекулах ДНК та РНК відбуваються різні фотофізичні процеси, які мають, відповідно, різні спектральні прояви.

При температурі $T = 77$ К аналіз кривих спектрів фосфоресценції (рис. 5, б) дещо ускладнюється, оскільки в спектрах рАМФ та $2'5'A_3$ характерна аденінова структура майже зникає. Однак закономірності, описані для оліго-РНК, тРНК та полі(рАрУ) при $T = 4,2$ К, зберігаються і при $T = 77$ К.

Таким чином, проведено порівняльні дослідження спектрів поглинання зразків ДНК, РНК, полі-, оліго- та моно-нуклеотидів під час фоторуїнування жорстким ультрафіолетовим світлом ртутної лампи ДРТ-1000. Попередньо з'ясовано [5–7], що дАМФ та сполуки, що містять АТ-

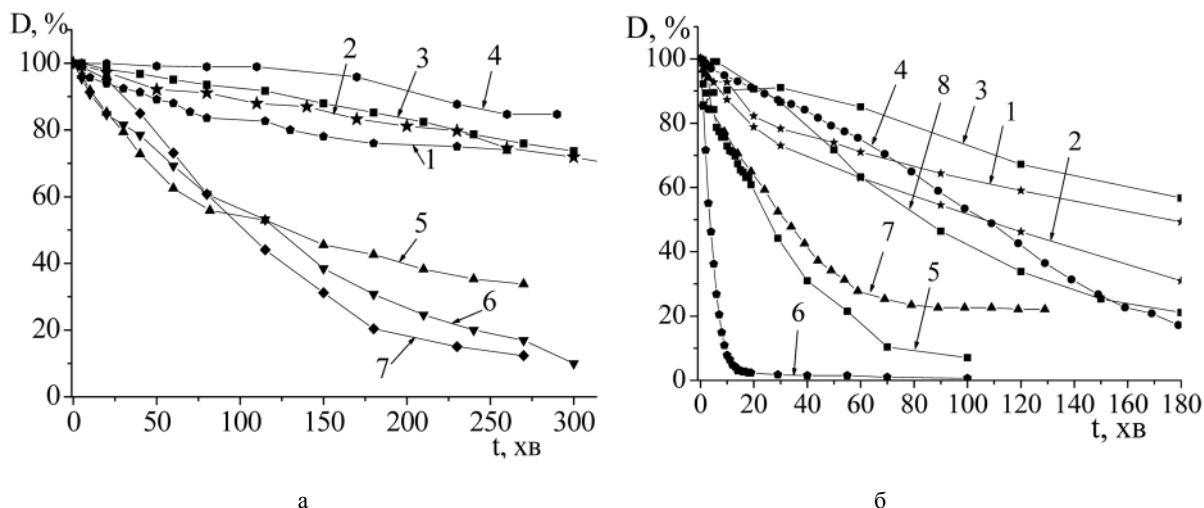


Рис. 6. Залежність оптичної густини довгохвильового максимуму поглинання: а): 1-ДНК, 2- д(ЦЦГГГТТТААА), 3-полі(дАдТ)₂, 4-дАМФ, 5-дЦМФ, 6-дТМФ та 7-дГМФ, б): 1-тРНК, 2-олігоРНК, 3-2'5'А₃, 4-рАМФ, 5-рЦМФ, 6-рУМФ, 7-рГМФ та 8-цикло-2'5'А₃ під дією УФ-випромінювання (оптичну густину подано в % від початкового значення незруйнованого зразка)

послідовність (ДНК, д(ЦЦГГГТТТААА) та полі(дАдТ)₂), суттєво стабільніші ніж інші дезоксирибонуклеотиди. Про це свідчить той факт, що криві зміни оптичної густини з часом ДНК, д(ЦЦГГГТТТААА), полі(дАдТ)₂ та дАМФ (рис. 6, а, кр. 1–4) після 250 хв. опромінення перебувають у межах 80÷100 %, тоді як для дЦМФ, дТМФ та дГМФ (рис. 6, а, кр. 5–7) оптична густина за цей час спадає до 10÷30 %, що свідчить про їхню меншу стабільність. Подібна ситуація спостерігається і для РНК та рибонуклеотидів: криві зміни оптичної густини з часом для рЦМФ, рУМФ та рГМФ (рис. 6, б, кр. 5–7) набагато швидше спадають, ніж у сполук, що містять аденозин (РНК, 2'5'А₃ та рАМФ) (рис. 6, б, кр. 1–4, 8). Слід зазначити, що циклізація тримеру 2'5'А₃ призводить до суттєвого погіршення його фотостабільності (наприклад, рис. 6, б, кр. 3, 8). Аденозинова база ДНК і РНК найстабільніша. Таким чином, у макромолекули РНК реалізується механізм самозахисту проти зовнішніх негативних впливів (подібний до ДНК), що проявляється у локалізації (з наступною дезактивацією) триплетних електронних збуджень на найстабільнішій базі РНК – аденозиновій.

Порівнюючи динаміки фоторуйнування макромолекул ДНК і РНК, а також відповідних їм нуклеотидів, встановлено, що ДНК стабільніша ніж РНК. Про це свідчить те, що оптична густина ДНК (рис. 6, а, кр. 1) за час 300 хв. змінюється від 100 % до 80 %, тоді як для тРНК за час 180 хв. змінюється від 100 % до 60 %, а для олігоРНК – від 100 % до 40 %. Зміна оптичної густини з часом рибонуклеотидів (рис. 6, б, кр. 4–7) відбувається набагато швидше, ніж у відповідних їм

дезоксирибонуклеотидів (рис. 6, а, кр. 4–7). Це підтверджує те, що рибонуклеотиди – бази РНК – набагато менше стабільні порівняно з дезоксирибонуклеотидами – базами ДНК. Таким чином, ДНК більш стабільна ніж РНК не тільки завдяки наявності двох ланцюгів, а й завдяки більшій фотостабільності, власне, нуклеотидних π-електронних систем.

Висновки

Порівняльними дослідженнями ДНК, РНК, низки полі- та олігонуклеотидів показано, що так само, як у ДНК, у РНК нуклеотиди є незалежними поглинаючими центрами, тому можуть бути використані для побудови схеми ієрархії енергетичних рівнів РНК. На відміну від ДНК, у РНК не утворюється комплекс, подібний до АТ-комплексу, що відповідає за фосфоресценцію. Натомість ієрархія енергетичних рівнів у РНК така, що основною пасткою триплетних збуджень є аденозинові ланки, які найстабільніші порівняно з іншими нуклеотидами. Рибонуклеотиди є менш стабільними порівняно з дезоксирибонуклеотидами. Отже, ДНК стабільніша за РНК не тільки через наявність двох ланцюгів, а й завдяки більшій фотостабільності нуклеотидних π-електронних систем.

Подяка

Автор висловлює щирі подяки проф. В. М. Яцуку, проф. В. І. Мельнику, В. П. Воробйову за підтримку та цінні ідеї під час виконання цього дослідження, а також З. Ю. Ткачу та І. Я. Дубею за надані зразки біологічних речовин.

1. Bersohn A. Phosphorescence in nucleotides and nucleic acids / A. Bersohn, I. Isenberg // J. Chem. Phys. – 1964. – Vol. 40, № 11. – P. 3175–3180.
2. Rahn R. O. Phosphorescence and Electron Spin Resonance Studies of the uv-Excited Triplet State of DNA / R. O. Rahn, R. G. Shulman, J. W. Longworth // J. Chem. Phys. – 1966. – Vol. 45, № 8. – P. 2955–2965.
3. Lamola A. A. Triplet State of DNA / A. A. Lamola, M. Gueron, T. Yamane, J. Eisinger, R. G. Shulman // J. Chem. Phys. – 1967. – Vol. 47, № 3. – P. 2210–2217.
4. Gueron M. Excited States of Nucleotides and Singlet Energy Transfer in Polynucleotides / J. Eisinger, R. G. Shulman // J. Chem. Phys. – 1967. – Vol. 47, № 10. – P. 4077–4091.
5. Yashchuk V. The nature of the electronic excitations capturing centres in the DNA / V. Yashchuk, V. Kudrya, M. Losytskyy, H. Suga, T. Ohul'chanskyy // Journal of Molecular Liquids. – 2006. – Vol. 127, Iss. 1–3. – P. 79–83.
6. Yashchuk V. M. The effect of triplet-triplet excitation energy transfer on the DNA self-protection mechanism / V. M. Yashchuk, V. Yu. Kudrya, M. Yu. Losytskyy, I. Ya. Dubey, T. Y. Ohulchanskyy, H. Suga, S. M. Yarmoluk // Наукові записки НаУКМА : Фіз.-мат. науки. – 2006. – Т. 51. – С. 48–56.
7. Yashchuk V. M. Electronic Excitation Energy Transfer in DNA. Nature of Triplet Excitations Capturing Centers / V. M. Yashchuk, V. Yu. Kudrya, M. Yu. Losytskyy, I. Ya. Dubey, H. Suga. // Mol. Cryst. Liq. Cryst. – 2007. – Vol. 467. – P. 311–323.
8. Yashchuk V. M. Some Peculiarities of Electronic Excitation Energy Structure of the Biologic Polynucleotides and Processes of Triplet Excitation Trapping / V. M. Yashchuk, V. Yu. Kudrya, S. M. Levchenko, N. V. Yevtushenko // Наукові записки НаУКМА : Фіз.-мат. науки. – 2007. – Т. 61. – С. 39–42.
9. Kudrya V. Yu. The Peculiarities of the RNA Luminescence / V. Yu. Kudrya, V. M. Yashchuk, S. M. Levchenko, V. I. Mel'nik, L. A. Zaika, D. M. Govorun // Mol. Cryst. Liq. Cryst. – 2008. – Vol. 497. – P. 93–100.
10. Горбань И. С. Особенности элементарного акта переноса энергии электронного возбуждения в макромолекулах / И. С. Горбань, В. Н. Ящук, А. Я. Кальницкий, В. П. Найденков // Журнал прикладной спектроскопии. – 1987. – Т. 47, № 1. – С. 96–101.
11. Gorban' I. S. Effect of intrachain spreading of the vibrational excitons on phosphorescence of carbazole-based macromolecules / I. S. Gorban', Yu. P. Piryatinsky, V. M. Yashchuk // Molecular Materials. – 1992. – Vol. 1. – P. 241–246.

V. Kudrya

THE SPECTRAL PROPERTIES AND PHOTOSTABILITY OF NUCLEIC ACIDS AND OLIGONUCLEOTIDES

In the present paper the comparative investigations of the spectral properties and photostability of the DNA, RNA macromolecules, poly- and oligonucleotides were done. It is confirmed the nucleotides in the RNA are almost independent absorbing centers as well as in the DNA. In contrast to the DNA in the RNA the complex like AT-complex that is responsible for the phosphorescence emitting is not created. Instead of this the main triplet electronic excitations traps in the RNA are adenosine links that are the most photostable against UV-irradiation than all other nucleotides. This fact provides the existence of the RNA self-protection mechanism against damage caused by UV-irradiation. It is found the ribonucleotides are significantly worse photostable comparing with correspondent deoxyribonucleotides. This phenomenon is one of the main reasons the DNA is more photostable than the RNA.

Keywords: DNA, RNA, phosphorescence, photostability.